

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—157723

⑤ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和58年(1983)9月19日
A 61 K 37/04		7138—4C	
37/00		7138—4C	発明の数 1
// A 61 K 35/12		7138—4C	審査請求 未請求
35/14		7138—4C	
35/28		7138—4C	
35/84		7138—4C	

(全 18 頁)

⑭ インターロイキン 2 を含有してなる免疫療法
剤

⑯ 特 願 昭57—40369
⑯ 出 願 昭57(1982)3月15日
⑯ 発 明 者 吉元良太
川崎市幸区鹿島田958
⑯ 発 明 者 鹿島信一

横浜市旭区若葉台 2—21—603
⑯ 発 明 者 羽室淳爾
横浜市戸塚区深谷町241—32
⑯ 発 明 者 光木浩司
横浜市旭区中沢町80—170
⑯ 出 願 人 味の素株式会社
東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8
号

明 細 書

1 発明の名称

インターロイキン 2 を含有してなる免疫療法剤

2 特許請求の範囲

- (1) ヒト細胞由来のヒトインターロイキン 2 を含有してなる免疫疾患治療予防剤。
- (2) ヒト細胞がヒトリンパ球、同クローン化細胞またはハイブリドーマである特許請求の範囲第 1 項記載の薬剤。
- (3) ヒトインターロイキン 2 の比活性が 2×10^5 unit/μg 蛋白質であり、他のヒトリンホカイン、モノカイン活性を含有しないものである特許請求の範囲第 1 項記載の薬剤。
- (4) 免疫疾患が癌、細菌感染、ウイルス性疾患、免疫不全症または自己免疫疾患であるところの特許請求の範囲第 1 項記載の薬剤。
- (5) ヒトインターロイキン 2 を含有してなる薬剤がヒトインターロイキン 2 と他の化学療法剤も

しくは／および他の免疫療法剤を含有してなる薬剤もしくはヒトインターロイキン 2 を含有する第 1 剤と化学療法剤もしくは／および他の免疫療法剤を含有する第 2 剤よりなる薬剤キットとして構成される特許請求の範囲第 1 項記載の薬剤。

(6) 他の免疫療法剤がインターフェロンもしくは免疫活性多糖である特許請求の範囲第 5 項記載の薬剤。

(7) 免疫活性多糖がレンチナンである特許請求の範囲第 5 項記載の薬剤。

(8) ヒトインターロイキン 2 を含有してなる薬剤がヒトインターロイキン 2 と免疫原としての抗原を含有してなる薬剤もしくはヒトインターロイキン 2 を含有する第 1 剤と抗原を含有する第 2 剤よりなる薬剤キットとして構成される特許請求の範囲第 1 項記載の薬剤。

(9) 免疫原としての抗原が腫瘍抗原、細菌抗原またはウイルス抗原であるところの特許請求の範囲第 8 項記載の薬剤。

3 発明の詳細な説明

本発明はヒトインターロイキン2（以下、「インターロイキン2」を「I L-2」と略記することがある。）を含有してなる免疫療法剤、更に詳しくはTリンパ球、同クローン化細胞、ヒト悪性化細胞もしくはハイブリドーマの細胞培養やこれらの細胞を起源として製造されるヒトI L-2を含有することとを特徴とする痛、細菌感染、ウイルス性疾患、免疫不全症、自己免疫疾患などを含む免疫疾患患者に臨床適用することのできる免疫疾患の治療、予防剤に関するものである。

今日、免疫療法は、医学の広い分野において新しい治療、予防方法として期待されはじめている。例えば、感染症の分野ではオポチュニスティック・インフェクションズ（Opportunistic Infections）は、新生児の機能的免疫不全、癌患者、骨髄など移植適用患者、ステロイドや化学療法剤投与により免疫抑制の惹起された患者、老人などに頻発し、緑膿菌感染などとはくに重篤な症状をもたらす。従前使用されている抗生物質は、上述の免疫機能

- 3 -

いる1, 2の免疫療法剤は、細胞に対し直接細胞毒作用も併せ持つという化学療法剤の性格を有する。従つて、癌患者に真に免疫療法剤として適用され既に明確な臨床効果が第3相試験で確認されているものとしては、本発明者らになるレンチナンを挙げることができるのみである。レンチナンの抗癌作用機構としては、リンホカインとの相乗作用による免疫エフェクターの誘導増強作用が重要な役割を果たしていると考えられるが、レンチナンの投与時期によつては生体内のリンホカイン量が欠如していると充分の効果の発現しない同系統の系も存在する。なお、レンチナンの臨床効果については、たとえば、「癌と化学療法」第8巻第944～966頁（昭和56年）を参照。

また、従前開発中の免疫活性物質の多くには副作用の観察される場合もあり、この意味でも生体由来でその特徴的かつ特異的な作用の詳らかな生体由来免疫活性物質を薬剤として開発することがその有効性への期待とともに、待ち望まれている。

一方、作用機構よりみた場合、開発中の免疫活

- 5 -

不全または免疫抑制状態においては殆んど有効性を示さない。

ウイルス性疾患においても、多大の努力にも拘わらず充分治療効果を示す化学療法剤は未だ臨床に採用されるには至らず、インターフェロンについても物質の性状、生産規模、作用機構の解明など幾多の問題を拘え本格的臨床使用に至るまではその有効性は明確でない。また、インターフェロンの場合には、薬剤として適用されるヒトインターフェロンそのものが動物では効能を発揮せず、種特異性の存在のため薬剤の開発に必須の動物実験ができないという限界がある。

癌患者においても、上述の感染症、ウイルス性疾患と薬剤開発の状況は類似する。患者における免疫機能の如実な低下、抑制が立証されるにつれ第4の療法としての免疫療法には大きな関心が寄せられている。癌に対する免疫応答を増強、修復するのみでなく、担癌患者における一般免疫能の改善は宿主機能の改善として有用であるとも言われている。従前癌患者に医薬品として使用されて

- 4 -

性物質の多くは免疫エフェクターの内、活性化マクロファージの誘導増強作用により活発効果の期待されるものであり、本エフェクターは標的に対し非特異的に作用するもので、厳密に規定された特異性は有しない生体防禦機構賦活物質である。

特異的免疫応答の発現に重要な役割を担うものとしてはTリンパ球があり、免疫エフェクターとして標的に特異性を示す細胞障害性Tリンパ球が重要な作用を有することが示唆されている。

本発明の構成要素である物質ヒトI L-2は、上述のTリンパ球の活性化、増殖に重要な働きを示すことがin vitroの基礎実験で示されている生体由来の微量生理活性物質として規定しうる。

In vivo動物実験においては、本I L-2の作用は未だ不明であり、他のモノカイン、リンホカインを含有するネズミI L-2を粗組成物とするものについて免疫機能の修復が若干報告されているにすぎず、またヒトI L-2については動物実験においてその作用、免疫活性、薬効の何れもが不明である。なお、ネズミI L-2はヒトI L-

- 6 -

— 2 — とは分子量をも異にする別物質である。このようにヒトIL-2の薬剤としての効果即ち治療・予防効果は全く不明である。このように、ネズミIL-2については若干の免疫活性の予知されたものであるが、桜井欽夫ら「悪性腫瘍に対する免疫療法剤の評価法に関する」医薬品研究11巻748(1980)に従えば免疫活性を示すことは直ちに薬効を示すものでないことが規定されている。

一般に免疫療法においては、種々の抗原もしくは抗原含有物からなる免疫原即ちワクチンを投与する所謂能動免疫の試みもあるが、生体側の免疫機能が欠損もしくは不全状態では、罹患者、感染症患者、ウイルス性疾患患者をとわず殆んど効果を上げない。液性免疫の増強により疾患の治療、予防を意図する場合には、上述のワクチンとともに液性免疫の非特異的な担い手の一つである免疫グロブリンを投与する試みがなされつつある。細胞性免疫の増強による治療、予防が期待される疾患に対しては液性免疫におけるヒト免疫グロブ

— 7 —

により免疫系疾患に顕著な薬効の得られることを見出すとともに、ヒトリンパ球、同クローン化細胞、悪性化細胞、ハイブリドーマの細胞培養により得られるヒトIL-2を大量に製造、単離・精製する技術を既に完成しており、こうして得られた他のリンホカイン、モノカインを含有しないヒトIL-2を用い動物実験でその免疫疾患に対する薬効を確認するとともに、ヒトIL-2により免疫エフェクターが確かに生成されることを立証し、上に詳述した現在の免疫療法のかかえる諸問題を解決する新しい免疫療法剤を発明、完成した。

即ち本発明はヒトIL-2単独又は他物質との併用によつて始めて免疫系疾患に対する画期的な新免疫療法剤としての薬効を見出し、免疫療法の新しい進歩に寄与するところ大なる有用な免疫療法剤に関するものである。

本発明に用いられるヒトIL-2は、たとえば、ヒト末梢血、扁桃腺、脾臓等より得られるリンパ球を単独もしくはホルボールエステルの存在下で12〜48時間Tリンパ球マイトジェンであるフ

— 9 —

リンに対応する生体由来免疫活性物質が臨床に提供されず、ワクチンを用いる能動免疫は期待されつつも、今のところ患者に適用を試みることが不可能である。

以上述べてきたように、種々の免疫疾患に対する従来の免疫療法は非特異的免疫療法に属するものであり、Tリンパ球を介する細胞性免疫応答を増強もしくは調節することによる特異的免疫応答の人工的制御による治療は厳密には未だ試みられていないか不十分である。能動免疫としてのワクチン療法は免疫機能に障害のある実際の患者には効果が弱く、殺細胞作用を中心とする化学療法剤や抗菌作用のみの抗生物質の投与では顕著な作用が惹起される。

本発明者らは、Tリンパ球特異的免疫アジュバントであるレンチナンの作用を詳細に検討する中で、免疫応答を制御するには、リンホカインに対する免疫エフェクター前駆細胞の応答性を改善することとともに、免疫エフェクター誘導を行なう1次シグナルとしてのリンホカインを投与すること

— 8 —

イトヘマグルチニン(PHA)、コンカナバリンA(ConA)、プロテインA(ProA)等で刺激して得られる。また、これらヒトリンパ球をプールして、Raji細胞、^Daudi細胞で代表されるヒトB-リンホプラスト(B-lymphoblast)の存在下に上述のTマイトジェンで刺激すると一層高活性のヒトIL-2が得られる。更に、本発明者らは、ヒトT白血病細胞株やTリンパ球細胞株を培養し、血清添加または血清アルブミン添加無血清培地や血清アルブミンすら含まぬ合成培地で上述のTリンパ球マイトジェンによる刺激を含有する工程でもヒトIL-2を調製できることを見出した。この場合にもヒトB-リンホプラストの共存やホルボールエステルの共存は産生能の増大に有効である。また、本ヒト細胞株をクローン化して得られるクローンの幾つかはマイトジェン刺激なしに自発的にヒトIL-2を産生することも見出された。また、ヒトリンパ球や上述のヒト細胞株を細胞融合して得られるハイブリドーマよりTリンパ球マイトジェンの存在もしくは非存在下

— 10 —

に産生されるヒトIL-2も、本発明に用いることができる。更には、上述の細胞よりえられたノックアウトRNA (mRNA) を利用してリコンビナントDNA (recombinant DNA) を作成する遺伝子工学的手法で作成されるヒトIL-2も、その生物活性が後述の範囲に入る限りにおいて、本発明の薬剤に含有されるヒト細胞由来のヒトIL-2である。

上述の如き細胞培養法により培養上清に生成、密蔵されたヒトIL-2は、通常の単離、精製法によつて濃縮、精製するとよい。即ち、塩析、濃縮、真空透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、調製用等電点電気泳動、ゲル電気泳動法等の種々の方法を単独または適宜組み合わせて用いる。

本発明の実施例において用いられるヒトIL-2は、培養上清を4℃において限外濾過濃縮器ホロファイバーHIP6 (アミコン社製DC2型) を用い短時間の間に約10~20倍濃縮し、次いで85%硫酸で塩析し、セファデックスG-15

- 11 -

で蛋白分解酵素で失活し、56℃1時間熱処理安定で、pH 2.0~9.0の範囲で安定である。

ヒトIL-2の活性は、次のようにして検定した。

組織培養プレートの個々のくぼみ (well) に、活性を検定しようとする検体を適当な濃度範囲で2段階希釈し100 μ l ずつ分注した。そこにギリスラ (ネーチュア (Nature) 268巻154頁 (1977)) によつて教示された方法に従つて作成した活性化Tリンパ球株を 4×10^5 個/100 μ l の濃度にて100 μ l ずつ各くぼみに添加した。37℃、5% CO₂ 含有空気の下気下20時間培養し、ここにトリチウム化チミジン0.5 μ Ci を加え、4時間培養し、この分野において良く知られた方法により細胞を採取し細胞内に取り込まれた放射線量を測定した。ヒトIL-2の比活性は、トリチウム化チミジンの取り込みの最高値の50%の値の取り込みを示す検体の希釈度のプロビットプロットより算出した。又、ヒトIL-2

- 13 -

(ファルマシア社製) で脱塩後、DEAE-セロースで段階層出を行ない、pH 7.8の0.06M トリス緩衝液での層出区分をブールしたのち乾燥を行ない、次いでフェニルセファデックスカラム (ファルマシア社製) を通し、更に調製用等電点電気泳動装置 (ファルマシア社製FRE 3000) にてファルマシア社製ファルマライト (pH 5~8) で展開し、単一バンドとして得られたものである。上記凍結乾燥品を実施例に示すようにコントロールドポアガラスビーズカラムクロマトグラフィー及びオレンジセファロースクロマトグラフィーに付してもよい。

本精製操作によりヒトIL-2は、後述の活性検定法により、比活性はロットを問わず 2×10^5 unit/ μ g以上を示した。

このようにして得られたヒトIL-2は、ギリスラ「インターロイキン2依存性の細胞障害性T細胞株の培養」(Immunological Reviews 54巻81~109頁 (1981)) に示されるものと類似の物性を示し、分子量15,000

- 12 -

の活性を検定するために、アロ抗原刺激で生成するアロキラーT細胞の記憶細胞に検体を添加し、37℃で3~4日培養後、出現したアロキラーT細胞による標的細胞の細胞障害度を⁵¹Cr 標識標的細胞よりの⁵¹Cr の上清への遊離でも測定を行なつたところ、前述の活性化Tリンパ球の増殖をみる方法での測定値と相関のあることを確認した。

該分野で用いられるIL-2の活性検定法と称せられるものには様々のものがあるが、必ずしもIL-2の特異的活性検定法でないものがあり、Tリンパ球よりもしくは共存マクロファージ単球より生成する他のリンホカインやモノカインの共存がIL-2の特異的活性検出を妨害している場合が頻々である。上述の活性化Tリンパ球の増殖をみる方法が現在最も信頼されるヒトIL-2の特異的検出法である。

本発明者らは、ヒトIL-2の薬剤としての発明を完成した。

上述の、他のリンホカイン、モノカインが含有されている粗ヒトIL-2を用いたのでは、薬理

- 14 -

作用の本体が何に由来するのか定かではないために臨床に適用する場合に薬剤の投与時期、投与量を明確に規定することが困難である。

本発明になる薬剤に含有されるヒトIL-2に他のリンホカインであるTリンパ球代替因子、コロニー刺激因子、免疫インターフェロン、インターロイキン1、マクロファージ活性化因子が含まれているかどうかは、当該分野においてよく知られる方法により検定される。簡単に記すと以下の如くである。(i) Tリンパ球代替因子の存在しないことは、本薬剤中にTリンパ球を抗T_H1抗体により除去した脾臓細胞中に抗体産生細胞を出現させる活性がないことにより検定される。(ii) コロニー刺激因子の存在しないことは、骨髓細胞を*in vitro*でメテルセルロース中で培養する際、本薬剤を添加しても骨髓細胞にコロニー形成が見られないことにより検定された。(iii) 免疫インターフェロンの活性の存在しないことは、本薬剤中に抗ウイルス直接作用のないことにより検定される。(iv) IL-2非産生細胞株LBRM33-1A5は

- 15 -

癌、細菌感染、ウイルス性疾患や免疫不全症を含む免疫系疾患においてTリンパ球機能が重要な働きをしていることは既に明確にされている。

本発明を構成するヒトIL-2は、活性化もしくは抗原で感作されたTリンパ球のクローンを拡大し増殖する作用を有することが確認され、Tリンパ球機能異常の関与する疾患に対し薬理効果を発現することが期待される。

以下、本発明を構成するヒトIL-2を用いて見出された薬理効果を列記する。(i) マウス腫瘍細胞FB1-3に対し生成し長期継代培養されている正常な細胞障害性Tリンパ球株CTL-2の増殖の顕著な促進効果。(ii) 主要組織適合性抗原(H-2)の不適合な脾臓細胞の組み合わせで生成されたアロキラーTリンパ球、リンパ球と腫瘍細胞の混合培養で生成されたアロキラーTリンパ球およびパプタン特異的H-2支配キラーTリンパ球の増殖の顕著な促進効果およびこれらキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーTリンパ球(CTL)の抗原非存在下での誘導効果。(iii) PNA⁺(ビーナ

- 17 -

インターロイキン1を4時間作用させるとIL-2産生細胞に転換し、ConA刺激によりIL-2を産生する。LBRM33-1A5に本薬剤を4時間作用させてもIL-2産生細胞への転換は生じないことから、本薬剤がインターロイキン1を含まないことが検定された。(iv) マクロファージ活性化因子の活性の存在しないことは、本薬剤を*in vitro*でマクロファージに作用させても、マクロファージに対し抗腫瘍細胞活性(腫瘍細胞のDNA合成阻害)を誘起しえないことにより検定される。

本発明者らは、前述の技術の工夫により、種々の方法で得られ単離、精製され明確に規定された性状と機能を有し、他のリンホカイン、モノカインを含有しないヒトIL-2を大量に生産し、その薬理作用を検討することによりヒトIL-2が癌、細菌感染、ウイルス感染、免疫不全症、自己免疫疾患を中心とする免疫系疾患に明確な薬効すなわち治療、予防効果を有することを見出し新しい免疫療法剤を発明した。

- 16 -

ツツ・アグルチニン結合性)脾臓細胞にConAを共存させる培養系において、顕著な増殖誘導効果(本効果はインターロイキン1では観察されない)。(v) *in vitro*で脾臓細胞のナチュラルキラー細胞(NK)活性の増強効果。(vi) *in vitro*で脾臓細胞のNK活性を増強する場合のインターフェロンまたはインターフェロン誘起物質(インデュサー)との相乗効果。(vii) *in vivo*で脾臓細胞のNK活性を増強するにあたり*in vitro*レンテナン投与との相乗効果。(viii) 同系癌担癌の免疫機能の抑制されたマウスの脾臓細胞を応答細胞とするキラーT誘導培養系において*in vitro*で本誘導を修復、増強する効果。(ix) 同系癌担癌のNK活性の抑制されたマウスの脾臓細胞のNK活性を修復、増強する効果。(x) 通常CTLの誘導されない、Ia⁺-マクロファージ(インターロイキン1産生細胞)非存在下のH-2不適合な脾臓細胞の混合リンパ球培養においてアロキラーTリンパ球を誘導する効果。

以上(i)~(x)に示した効果は本発明を構成するヒ

- 18 -

ト IL-2 が確かに他のリンホカインとは異なること、Tリンパ球の増殖維持、分化活性を有すること、*in vitro* において免疫エフェクターとして重要なCTL、NK活性を誘導増強すること、これらの免疫エフェクターの誘導がレンテナン、インターフェロンやインターフェロン誘起剤と相乗効果を示すこと、またこれらの免疫エフェクターの誘導の修復、増強が免疫機能の抑制された生体のリンパ球に対しても発揮されることを如実に示すものである。単に免疫活性を示すのみでなく、免疫疾患の治療、予防に重要な証拠となる免疫エフェクターたるCTL、NKの活性化の増強および修復をなすことは大きな意義を有する。

次に *in vivo* のヒトIL-2投与により確認された生物活性、免疫活性を列記する。(α)NK活性の単独投与もしくはインターフェロンと併用投与による増強効果。(β)アロCTL活性の増強効果。(γ)同系癌拒絶マウスに単独もしくはレンテナンと併用して投与した時のCTL誘導増強活性。(δ)羊赤血球(SRBC)等の抗原を用いる遅延型過敏症

- 19 -

への投与によつても免疫疾患の治療、予防に有用な効果を示すことが明らかになった。特にIL-2投与により生体内で特異的免疫エフェクターとしてはたらくCTL誘導機能を顕著に増強させること及び非特異的免疫エフェクターとしてはたらくNK活性化を顕著に増強させることに始めて成功したのは本発明の重要な知見である。老令生体では種々の免疫機能が低下していることが知られており、また最近ギリスら(J. Clin. Invest. 67巻937頁(1981))は老令生体でIL-2の生産能の低下していることを示しており、ここに示した *in vivo* での効果はIL-2が実際に薬剤として汎く免疫機能の改善に有用であることを示す。又、上述(α)~(δ)の効果に示すとおり、IL-2とレンテナンもしくはインターフェロンとの *in vivo* での相乗効果も明らかである。

更に、(ε)、(ζ)に示すように免疫原たる抗原、腫瘍に対する細胞性免疫応答の *in vivo* での増強効果は、ヒトIL-2が免疫原たる抗原と共に投与した場合に免疫アジュバントとして作用すること

- 21 -

反応を指標とする細胞性免疫の増強効果。(η)腫瘍抗原による遅延型過敏症反応を指標とする特異的免疫応答の増強効果。(θ)同系癌拒絶マウスにおける免疫抑制状態への投与によるCTL誘導、NK活性化、遅延型過敏症反応を指標とする細胞性免疫の修復効果。(ι)Tリンパ球機能の欠損したヌードマウスへの投与による抗SRBC抗体産生、CTL誘導機能の発現効果。

以上(α)~(ι)に示した効果は、ヒトIL-2が、*in vitro* でなく *in vivo* においても10~100 unitの投与により、生体内での吸収・分解・代謝にも拘らず、確かに免疫活性を示すことを始めて見出したことを示すものであり、*in vitro* で観察されたように、*in vivo* においてもTリンパ球の増殖、分化活性を有すること、CTL、NKの如き重要な免疫エフェクターの誘導増強作用を有すること、またこれら免疫機能が抑制、不全、欠損の生体においても、ヒトIL-2の投与でこれらの機能が修復、増強されることを示すものである。このことにより始めてヒトIL-2が生体

- 20 -

を示しており、能動免疫におけるヒトIL-2の薬剤としての有用性を示すものである。

本発明者らは、最後にヒトIL-2の動物実験における薬効試験を実施し、以下に列記する効果を見出した。既に述べた(α)~(δ)の効果より明らかなように、ヒトIL-2の薬剤としての有用性は以下に列記する範囲にとどまらず、当業者が容易に類推・実施しうる免疫系疾患全般を含むものである。

前記効果とは、すなわち、(1)同系癌拒絶動物の癌摘出手術後のヒトIL-2投与による延命効果、(2)同系癌に対する化学療法FT207、サイクロfosファミド投与との併用による延命効果、(3)腫瘍ワクチン投与との併用による同系癌拒絶動物の延命効果、(4)IL-2単独投与による同系癌の退縮、延命効果、(5)細菌感染に対する延命効果、(6)ウイルス性疾患に対する延命効果、(7)レンテナンとの併用による同系癌退縮効果である。

以上の効果より明らかな様に本発明者らの発明になるヒトIL-2は、前述の様々な免疫活性、

- 22 -

生物活性にもとづき、(I)~(III)に述べた様なin vivoでの実験に医学分野において有用な薬効を示す。しかもこれらの効果が確かにIL-2によるものであり、他の微量成分によるものでないことが判明した。

本発明になるヒトIL-2は、 2×10^4 unit/μg以上の比活性を有する程度に一旦精製されたものが望ましく、対象の疾患、患者の病状、免疫機能を配慮して使用量、使用回数を決める。また、投与経路は治療効果の実施例においては全て静脈内投与を示しているが、用法として本投与経路にのみ限局されるものではない。

上記比活性より弱い比活性を有するヒトIL-2を含有する薬剤や、他のリンホカイン、モノカイン等の微量成分を含有する薬剤も、本発明の趣旨よりして、本発明の技術的範囲に含まれることは明らかである。本発明は、ヒトIL-2そのものに、詳述したin vivoの治療、予防効果のあることの発見により完成したものであり、本効果を妨害しない他成分の含有は本発明の範囲に含まれる。

- 23 -

度で0.5%牛血清アルブミン(BSA)を含有する無血清培地R1TC-55-9 1000 μlに懸濁し、ファルコン社製回転培養瓶に入れ、ここにConAを10 μg/μlになるように添加し、密栓後37℃にて24時間回転培養した。培養終了後、培養上清を遠心操作で回収した。本培養液のIL-2活性は4096単位/μlであつた。

Jurkat-FHCRRC株およびJurkat-F1886株を同様に処理して得られたIL-2活性は各々64および28 u/μlであつた。

ヒト末梢リンパ球をT細胞成長因子の存在下に培養しクローン化したTリンパ球またはヒトTリンパ球とヒトT白血病細胞株CEMを細胞融合して得られたハイブリドーマを同条件下でConAで刺激した場合は、各々24および12 u/μlのIL-2活性を示した。

上述のJurkat-111株を使用して得られたIL-2を含有する培養上清は、まずホロフアイパー限外濾過濃縮器H1P5(アミコン社製DC2)を用いて10倍に濃縮し、85%硫酸で塩析

- 25 -

以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

実施例1: IL-2の製造

ヒト末梢Tリンパ球を、採血後該分野でよく知られた方法により、採取し 1×10^6 / mlの細胞密度となし、ここにヒトBリンパ球細胞株であるRaji細胞を 1×10^5 / mlの細胞密度で等容量添加し、更にコンカナバリンA(ConA) 25 μg/ml、ホルボールミリスチート・アセテート(PMA) 10 ng/mlを添加し、最終容量2000 μlとなした。これを10 mlのジャー式攪拌培養槽に入れ37℃にて48時間培養し、遠沈機体により細胞を分離してIL-2を含む培養上清を得た。用いた培地は1%の牛胎児血清を含むローズウエルバーク・ノモリアル・インスチテート(RPMI) 1640培地で、得られた培養上清は36 u/μlのIL-2活性を含有していた。なお、uはunitの略で、「単位」を意味する。

一方、ヒトT白血病細胞株ジュルカット

(Jurkat) - 111株を 4×10^5 / mlの細胞密

- 24 -

後セファデックスG-15(ファルマシア社製)で脱塩し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでイオン強度を変化させて段階溶出し、0.06 Mトリス緩衝液(pH 7.6)で溶出する分画をブールした。このブール分画を凍結乾燥後コントロールポアガラス(CPG) ビーズ(350 Å、フナコシ薬品製)を用いるクロマトグラフィーを行ない、0.3 Mグリシン塩酸緩衝液にて溶出し、IL-2活性分画をブールした。このブール分画を0.01 Mトリス緩衝液(pH 7.8)でオレンジセファロースカラムに吸着させ、0.01 Mトリス緩衝液(pH 7.6)、1.0 M NaClにて溶出し、得られたIL-2活性分画を50 mM重炭酸アンモニウム溶液に対し透析後、凍結乾燥により重炭酸アンモニウムを除去し、得られた分画を調製用電気泳動装置FBE3000(ファルマシア社製)を用いて展開し、平板ゲルを30片に切り、各ゲル中より蛋白質を滅菌蒸留水に対し溶出し透析IL-2の活性、蛋白質量を測定し、本発明に用いるヒトIL-2標品を得た。

- 26 -

本精製工程の概略を表1に示す。

表1 IL-2の精製

IL-2グレード	容量 (ml)	活性 (単位/ml)	全活性 (単位)	比活性 (単位/μg)
(A) 培養上清	10000	4.1×10^5	4.1×10^7	1.5×10^4
(B) DEAEクロマト画分	500	9.2×10^4	4.6×10^7	6.2×10^3
(C) CPG溶出画分	50	5.5×10^5	2.8×10^7	9.1×10^4
(D) オレンジセファロース画分	10	2.7×10^5	2.7×10^7	3.6×10^5
(E) 等電点電気泳動画分	10	1.1×10^5	1.1×10^7	8.2×10^5

なお、ここに得られたグレードEのIL-2は、マウスに静注した時100万単位にても全く死亡例がみられず、ヒト細胞の培養細胞に対しても10万単位/mlの濃度でも何等の殺細胞作用は示さなかった。グレードA、Cのものは10万単位/mlの濃度でL細胞の育成を阻害し、何等かの直接細胞毒物質の含まれることを示した。

- 27 -

図1Bより精製度の低いIL-2検体中にはIL-2に対し阻害活性を示すインヒビターの入っていることが判明した。

なお、図1A、図1Bにおいて、IL-2グレードは表1に示すものと同じである。

実施例3: in vitroにおけるキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーTリンパ球の誘導促進効果

CBA/Jマウスの脾臓リンパ球 4×10^6 と2,000レントゲンのX線照射を受けたBALB/Cマウス脾臓リンパ球 1×10^6 を2mlのトリック培地(牛胎児血清濃度5%)に懸濁し、Nunc社製24穴培養プレートで10日間培養し、アロキラーTリンパ球の記憶細胞を得た。本記憶細胞のキラー活性は認められなかった。

この記憶細胞を 5×10^4 細胞/穴宛96穴のマイクロプレートに添加し、ここに2段階希釈したIL-2検体を添加し最終容量200μlにてトリック培地中37℃にて5%炭酸ガスインキュベ

- 29 -

実施例2: in vitroにおけるTリンパ球の増殖

促進効果

活性化Tリンパ球株CTLを 1×10^4 /mlの細胞密度で24穴のNunc社製の培養プレートに1ml/wellの量で添加し、ここにIL-2検体を10μl添加して以後24時間ごとに本Tリンパ球数の増加を観察した。培養に用いた培地は、RPMI 1640培地で牛胎児血清5%を含むもので、37℃、炭酸ガス(7.5%)インキュベーター中にて培養した。~~オゾン染色後~~細胞をエオシン染色後顕微鏡にて生細胞および死細胞を計数した。

結果を図1Aに示す。

また、CTLを 1×10^4 /mlの細胞密度でRPMI-1640培地に添加し、2倍希釈列にて希釈したIL-2サンプルを1ml当たり100μl添加し、1ml/wellの容量で24穴プレート(NUNC社製)にて培養した。96時間後細胞をエオシン染色した後顕微鏡にて生細胞及び死細胞数を計数した。

結果を図1Bに示す。

- 28 -

ーター中3日間培養した。

培養液を洗浄後新鮮な培地と常法により ^{51}Cr で標識したP815-X₂マストサイトーマを 1×10^4 /穴宛添加し3時間37℃の5%炭酸ガスインキュベーター中で培養し、遊離する ^{51}Cr 液をオートガンマカウンターで測定することにより標的癌細胞P815-X₂の傷害を測定し、記憶細胞よりのキラーTリンパ球の誘導効果を測定した。

図2に結果を示す。IL-2グレードは表1のものと同じ。

実施例4: in vitroにおけるナチュラルキラー

活性の増強効果およびレンチナン、インターフェロンとの併用効果

C3H/HeNマウスの脾臓細胞を常法により採取し単細胞化したのち、グルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に 10^7 細胞/2mlに懸濁し、Nunc社製24穴培養プレートに添加し、ここにIL-2検体を100μl宛添加し、37℃、5

- 30 -

炭酸ガスインキュベーター中にて24時間培養し、得られた細胞を新鮮培養地2mlに角懸濁し、各1ml宛小試験法に分注し、ここに ^{51}Cr 標識YAC-1細胞を 2×10^4 宛添加し、4時間のインキュベーション後、上清に遊離される ^{51}Cr の量をヤートガンマカウンターで測定することにより標的癌細胞YAC-1の傷害度を求め、ナチュラルキラー細胞活性の活性化能を測定した。

レンチナンとの併用効果については、C3H/HeNマウスの脾臓細胞を採取する24時間前に1mg/kgの投与量でレンチナンを静脈注射しておいたC3H/HeNマウスの脾臓細胞を用いることにより検定した。

α -インターフェロンとの併用効果については、Nunc プレートにIL-2を添加する際に10³国際単位/ml α -インターフェロンを添加することにより検定した。

結果は図3に示す。使用したIL-2は表1のグレードEのものである。

- 3 1 -

実施例5: in vivoにおけるキラーTリンパ球誘導増強効果およびレンチナンとの併用効果

C57BL/6マウスの腹腔内にP815 $\frac{1}{2}$ X₁マストサイトーマ細胞を 1×10^6 / 0.5ml生理食塩水懸濁液として投与した。3日後と5日後にIL-2を100μlずつ尾静脈より注射し、10日目に脾臓細胞を採取し、これらエフェクター細胞と ^{51}Cr 標識標的細胞P815を100:1の比で混合し、3時間の ^{51}Cr 遊離試験により、キラーTリンパ球誘導増強効果を測定した。

表3に示す通り、IL-2投与群で生理食塩水投与の対照群に比し顕著な増強効果が認められるとともに、本増強効果がレンチナンの0.1mg/kg(1日目)の投与で更に増進されることが判明した。

- 3 3 -

実施例5: in vivoにおけるNK活性の増強効果およびレンチナンとの併用効果

C3H/HeNマウスの尾静脈にIL-2液体0.1mlを静脈注射し、3日後に同マウスの脾臓細胞を採取し、 2×10^6 細胞/ml宛DMEMに懸濁し、ここに ^{51}Cr 標識YAC-1細胞 2×10^4 / 100μl宛添加して、実施例4同様に ^{51}Cr 遊離試験を行ないNK活性の活性化効果を検定した。

レンチナンとの併用効果の検定はIL-2投与の1時間前に同一マウスに1mg/kgのレンチナンを腹腔内投与することにより検定した。

表2 IL-2のNK活性化効果(in vivo)

IL-2投与量 (単位/匹)	レンチナン投与 (0.1mg/kg)の有無	YAC-1の傷害度(%) E※	C※
対照(生食)	対照(生食)	22.3	22.3
対照(生食)	+	44.6	44.6
5	-	48.2	30.1
	+	62.3	48.3
25	-	64.2	45.3
	+	80.3	57.2
100	-	72.2	23.1
	+	81.3	40.8

※ 同いたIL-2の精製グレードを示す(表1参照)。

- 3 2 -

表3 IL-2のキラーTリンパ球誘導増強効果(in vivo)

IL-2投与量 (単位/匹)	レンチナン投与 (0.1mg/kg)の有無	P815の傷害度(%) E※	C※
対照(生食)	対照(生食)	25.2	25.2
対照(生食)	+	42.3	42.3
5	-	38.6	17.3
	+	70.4	20.6
25	-	60.3	26.4
	+	80.4	40.3
100	-	80.6	30.2
	+	82.3	40.4

※ 用いたIL-2の精製グレード(表1参照)を示す。

実施例7: 同系種拒絶マウスに投与することによる抗同系種キラーTリンパ球誘導の増強効果およびレンチナンとの併用効果

DBA/2マウスの皮下に 5×10^6 / 0.1mlのP815-X₁マストサイトーマを移植した。移植

- 3 4 -

後18日目にIL-2を100 unit/0.1 ml尾静脈より注射し、更に5日後に脾臓細胞又は腫瘍細胞を採取し各々単細胞化した。腫瘍細胞は更にフイコール(ファルマシア社製)の密度分画を行ない、リンパ球(88%純度)を集めた。各々をエフェクター:標的細胞=100:1で ^{51}Cr 標識P815を標的細胞として4時間の ^{51}Cr 遊離テストを実施し、脾臓細胞及び腫瘍局所中の同系統に対するキラーTリンパ球活性を検定した。

表4に示す通り、IL-2投与により始めて脾臓細胞及び腫瘍局所中に標的細胞を殺すキラーTリンパ球の産生がみられた。

表4 同系統に対するキラーTリンパ球産生の増強効果

(1) IL-2投与量 (単位/匹)		(2) レンチナン投与 (1mg/kg)の有無	P815 傷害活性例 (脾臓細胞局所リンパ球)	
対照(生食)	対照(生食)		0	0
対照(生食)	+		6	4
100	-		28	32
	+		42	54

- 3 5 -

対照として、MM46 腫瘍を移植しないC3H/HeNマウスにIL-2を同量静注したもの及びMM46と異なる腫瘍であるMM102 抗原を同蛋白相当量注射する系などをおいたが結果を図4に示す。

IL-2は表1の精製グレードEのものを使用。図4より明らかなように、MM46拒絶マウスにIL-2を投与した後、腫瘍抗原を投与した場合にのみ

MM46 腫瘍に対する特異的な遅延型過敏反応の増強が認められ、IL-2投与は同系腫瘍拒絶マウスにおいて当該腫瘍に対する特異的細胞性免疫反応を増強することが確かに立証された。

実施例9: 免疫抑制動物における免疫不全状態の回復効果

IL-2が免疫抑制状態にある動物に投与された場合にTリンパ球機能の回復を遂げ種々の免疫応答を回復させることを立証するため、拒絶マウスにおいてIL-2投与により免疫不全状態が修復されるか否かを検定した。即ち、DBA/2マウスに $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ のP815- X_{61} マストサイトーマを皮下移植し、腫瘍が充分に大きくなつ

- 3 7 -

(1) 用いたIL-2は精製グレードEのもので、Cのものでは本増強効果は単独でもレンチナン併用群でもみられなかった。グレードは表1に同じ。

(2) レンチナンはP815移植後、15、16、17日目に各1mg/kgずつ腹腔内投与した。

実施例8: 腫瘍抗原に対する特異的細胞性免疫応答の増強効果

C3H/HeNマウスに $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ の同系腫瘍MM46を移植し、腫瘍の大きくなつた移植後13日目にIL-2を100 u/0.1 ml生理食塩水の投与量で尾静脈より注射した。一方、MM46腫瘍抗原を3M-KClで抽出する常法で作成し、上記同系MM46 腫瘍拒絶マウスの足趾に0.60 mg蛋白相当量をMM46移植後20日目、IL-2投与後7日目に局所注射し24時間後の足趾の肥厚を測定することにより、同系腫瘍拒絶マウスの腫瘍抗原に対する特異的細胞性免疫反応である遅延型過敏反応の増強効果を検定した。

- 3 6 -

た時期にIL-2を投与し、(i)NK活性化の修復、(ii)アロキラー産生能の修復、(iii)羊赤血球SRBCに対する遅延型反応の修復の3つの効果を検定した。

(i) NK活性化

P815- X_{61} の移植後、16日、18日目に各50 u/0.1 ml生理食塩水のIL-2を尾静脈より注射して移植後20日目の脾臓細胞を採取し、エフェクター細胞:標的細胞=200:1にて、 ^{51}Cr 標識YAC-1細胞を標的細胞として4時間の ^{51}Cr 遊離テストを行ない、標的YAC-1細胞の傷害度例を測定することによりNK活性を測定した。

正常(非拒絶)マウスのNK活性は19.8%であつたのに対し、P815- X_{61} 拒絶マウスでは7.6%で有意に低下がみられたが、ここに精製グレードE(表1参照)のIL-2を静注した群では22.3%と顕著なNK活性化の低下状態の修復効果がみられた。

NK活性化の低下は正常DBA/2マウスに

- 3 8 -

P815 担荷 (腹水型) マウスの腹水を 0.5 ml ずつ 3 回腹腔内投与しても観察されたが (19.8 % → 6.4 %)、この場合にも上記同様の IL-2 投与で NK 活性は 23.4 % にまで修復された。

(H) フロキラー T リンパ球産生能

(i) 同様に処理し、P815-X₂ 皮下移植後 20 日目の脾臓細胞を採取し、本脾臓細胞を応答性細胞とし、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を 2,000 レントゲンの X 線処理したものを刺激細胞とし、実施例 3 に述べたと同様の条件下にフロキラー T リンパ球誘導の混合リンパ球反応を実施した。培養開始後 5 日目に細胞を採取し、エフェクター細胞：標的細胞 = 10:1 にて ⁵¹Cr 標識 EL4-サイモマを標的細胞として 3 時間の ⁵¹Cr 遊離テストを行ない、標的 EL4 細胞の傷害度 (%) を測定することによりフロキラー T リンパ球産生能を決定した。

正常マウスの脾臓細胞では本条件下に有意のフロキラー T リンパ球産生がみられるのに対し、P815-X₂ 担荷 DBA/2 マウスの脾臓細胞で

- 39 -

更に 8 日後に 1×10^6 の SRBC を再度足趾に注射し、24 時間後足趾の肥厚を測定した。

図 5 に示す通り、担荷免疫不全状態で抑制された足趾の遅延過敏反応は IL-2 の投与で正常以上の状態に修復増強されることが判明した。

実施例 10: T リンパ球免疫機能欠損動物における免疫機能発現効果

T リンパ球機能が欠損し、従つてキラー T リンパ球産生や T リンパ球依存性抗原に対する抗体産生のみられないヌードマウスにおいて、IL-2 投与がこれらの免疫機能を発現させることを以下のごとくに立証した。

BALB/C nu/nu マウスの足趾に 2,000 R の X 線照射をした C57BL/6 マウスの脾細胞 2×10^7 個を投与しアロ抗原による感作を連続 2 日行なつた。抗原投与開始と同時に表 1 の IL-2 サンプル E 100 μ l / 100 μ l を静脈内投与し、3 日おきに 3 回投与を続けた。10 日後、この BALB/C nu/nu マウスの脾細胞 4×10^6 個を

- 41 -

は同産生は全くみられない。しかしながら、このような免疫不全状態においても IL-2 を投与することによりフロキラー T リンパ球の産生が顕著にみられ、IL-2 投与が免疫不全状態の動物に免疫機能の修復に働くことが判明した。

結果を表 5 に示す。

表 5 P815 担荷 DBA/2 マウスよりのフロキラー T リンパ球産生の IL-2 による修復効果

	IL-2 投与量 (単位/匹) 投			
	(生理食塩水) 0	20	50	100
EL4 傷害度 (%)	0	46	52	54

※ IL-2 の精製グレードは表 1 の E₁₀₀

(H) 羊赤血球に対する遅延型過敏反応

(i) 同様に処理し、P815-X₂ マストサイトーマ 1×10^6 皮下移植後 20 日目に IL-2 を 50 μ l / 0.1 ml 静注された DBA/2 マウスに 25 日目に 1×10^6 の羊赤血球 SRBC を足趾に投与し、

- 40 -

~~2,000 R~~ の X 線処理をした C57BL/6 マウスの脾細胞 1×10^6 と共に 2 ml のグリツク/RPMI 培地に添加し 5 日間培養し、⁵¹Cr ラベルした EL4 細胞株を標的細胞としてキラー活性を測定した。

表 6 に示すとおり IL-2 投与により、T 細胞機能の欠損したヌードマウスにキラー T リンパ球産生を誘導できた。

表 6 IL-2 の in vivo 投与によるキラー T リンパ球の誘導 (標的細胞破壊率)

IL-2 投与	エフェクター細胞数 E : 標的細胞数 T			
	500:1	100:1	20:1	4:1
-	2	-1	-2	1
+	48	21	12	2

上表において、マウス: BALB/C nu/nu; 抗原: C57BL/6 脾細胞; IL-2: 表 1 のサンプル E; 標的細胞: EL-4; IL-2 投与: 100 unit / 100 μ l \times 3 回である。

- 42 -

BALB/C nu/nu マウスの腹腔内に抗原として羊赤血球 1×10^6 個を投与し、抗原投与と同時に表1の IL-2 サンプル E 100 v / 100 μ L を静脈内投与し、3日おきに3回投与を続けた。この BALB/C nu/nu マウスの脾細胞 0.75×10^6 個と羊赤血球 1×10^5 個を混合し、200 μ L の RPMI-1640 培地に添加し、36穴の平底マイクロプレート(コスター社製)に200 μ L / well の容積で5日間培養した。5日後各 well の細胞を回収しカニンガムの方法により出現した抗体産生細胞数を測定した。

表7に示すとおり、IL-2投与群のみに抗体産生の誘導がみられた。

表7 IL-2の in vivo 投与による抗体産生の誘導(PFC/culture)

IL-2投与	抗原量(個/well)	
	0	1×10^5
-	4	2
+	3	259

- 43 -

表8 EL4摘出後の IL-2 投与の治療効果

EL4移植	外科手術の有無	IL-2投与	平均生存日数	術後30日目生存数 用いた匹数
3×10^5	-	-	28	-
"	+	-	36	5/40
"	+	+(1)	>52	38/40
"	+	+(2)	38	7/40

(1) 表1の精製グレードEの IL-2、(2) 表1の精製グレードCの IL-2

実施例12:手術後の転移腫瘍に対する治療効果

手術後に少量残存する腫瘍細胞は免疫療法の最も期待される対象と考えられている。実験には、転移性のマウス同系腫瘍である L1210、
P388^{D₁}および MH134 腫瘍を対象として用いた。

L1210については、 1×10^4 個の腫瘍細胞を BDF₁ マウス足蹠皮下に移植後10日目に移植

上表にて、マウス: BALB/C nu/nu; 抗原: 羊赤血球; 培養: コスター 96 穴平底マイクロプレート; IL-2 投与: 100 unit / 100 μ L \times 3 回である。

実施例11: 精製腫瘍摘出手術動物に対する延命効果

C57BL/6 マウスに同系腫瘍である EL4 を 3×10^5 / 0.1 ml 皮下移植し、腫瘍が増大した14日目にナイロン糸を用い、本固型腫瘍を外科的に採取し、傷口をカットバンドで縫合し、翌日に IL-2 を 100 u / 0.1 ml 静注し、以降4日おきに3回、合計4回同様の IL-2 を静注し、各群のマウスの生存を測定したところ、表1の精製グレードEの IL-2 群においてのみ顕著な延命効果が観察された。

結果を表8に示す。

- 44 -

部位を切除した場合、切除後1、3、5日目に各100 u / 0.1 ml の IL-2 を投与した群では全例が完全治癒したが、IL-2 非投与の対照群では40%の死亡例がみられた(図6A)。

P388 D₁ は、 1×10^5 個を BDF₁ の足蹠皮下移植後同様に処置したところ、IL-2 投与群では80%が完全治癒したのに対して対照群では80%が死亡した(図1B)。

また MH134 については、 1×10^5 個を C3H/H^a マウスの足蹠皮下に移植し同様に処置したところ、IL-2 投与例は全例完全治癒したが、対照群では、術後60日目までに60%が死亡した(図6C)。

本実験結果は、グレードE(表1参照)の IL-2 投与で認められたものであるが、粗 IL-2 の場合にはこの様に明瞭な効果は認められなかった。

- 45 -

- 45 -

実施例 13 : 自家癌担癌動物に対する化学療法剤
との併用による延命効果

3-メチルコランズレン (MC) のオリーブ油懸濁液 (0.5 mg / 0.1 ml) を SWM / Ms マウスの腹部皮下に 0.1 ml 投与し、触知法により小豆大 (0.5 cm 直径) の腫瘍発生が 15 週目までにみとめられたマウスを集め、3 群に分けた。1 群は対照群となし、1 群にはサイクロフオスファミドを 100 mg / ㎏ 腹腔内投与し (1 日目)、一方他の 1 群にはサイクロフオスファミド 100 mg / ㎏ 投与後 20、22、24、26、28、30 日目に各 100 u / 0.1 ml の IL-2 を尾静脈より注射し、各群の平均生存日数を求めた。

対照無処置群は 45.0 日、サイクロフオスファミド単独投与群は 45.5 日、サイクロフオスファミドと IL-2 併用群では 123.8 日となり、併用群における顕著な生存日数の延長がみとめられ、IL-2 が化学療法剤との併用で自家癌に対しても抗腫瘍効果を示すことが立証された。

- 47 -

表 9 腫瘍抗原との併用投与による
LSTRA 担癌動物に対する
延命効果

抗原 LSTRA 細胞量	(1) 移植 LSTRA 腫瘍量	(2) IL-2 投与量 (単位/匹)	50 日目の生存数/処置数
10 ⁶	10 ⁶	-(生食)	4/30
10 ⁶	10 ⁶	50	24/30
10 ⁶	10 ⁶	100	28/30
10 ⁶	10 ⁷	-	0/30
10 ⁶	10 ⁷	100	20/30

(1) LSTRA 細胞を 8,000 レントゲン X 線処理したものを抗原として用いた。

(2) 用いた IL-2 は表 1 の精製グレード E のものである。

実施例 15 : 単独投与による同系癌の退縮および
担癌動物の延命効果

DBA/2 マウスに 1×10⁶ の P815-X₃ マストサイトーマを背部皮下に移植し、14、

- 49 -

実施例 14 : 腫瘍抗原との併用投与による同系担
癌動物に対する延命効果

マウス白血病細胞 LSTRA を 8,000 レントゲン照射して造腫瘍性をなくしたものを腫瘍ワクチン、すなわち、腫瘍抗原として用いた。X 線照射した LSTRA 死細胞 1×10⁶ を BAC^Δ/C マウスの足趾に注射し、本ワクチン注射後 5、7、9 日目に IL-2 50~100 u / 0.05 ml を静脈注射し、次いで 28 日目に LSTRA 生細胞を 10⁶ 足趾に注射し、マウスの生存を観察した。

腫瘍移植後 50 日目の生存数は表 9 の通りで、この場合にも腫瘍抗原と併用投与された IL-2 は治療効果を示し、種々の抗原に対し IL-2 がアジュバンドとして作用し、治療・予防効果を示すことが立証された。

- 48 -

16、18、20、22 日目の 5 回に分けて各回 100 u / 0.1 ml の IL-2 を静注し、4 週目の腫瘍退縮率を腫瘍重量より、又、100 日目の DBA/2 マウスの生存率を求めた。

グレード E の IL-2 (表 1 参照) の静注では顕著な抗腫瘍効果が腫瘍退縮効果及び延命効果において認められ、IL-2 は単独投与によつても抗腫瘍効果のあることが判明した。

結果を表 10 に示す。

表 10 IL-2 単位投与による抗腫瘍効果

皮下移植 P815 量	IL-2 投与量 (単位/匹)	28 日目の腫瘍退縮率 (%)	100 日目の生存数 (処置マウス数)
1×10 ⁶	対照 (生食)	-	0/40
1×10 ⁶	100 ⁽¹⁾	89	33/40
1×10 ⁶	100 ⁽²⁾	24	4/40

(1) 精製グレード E の IL-2 (表 1 参照)

(2) 精製グレード C の IL-2 (表 1 参照)

- 50 -

実施例 16: 細菌感染に対する延命効果

デイコ栄養培地で培養したエセリア・コリ菌 株 42 を $5 \times 10^7 / 0.2 \text{ ml}$ 宛 ddY マウスに腹腔内投与し、本感染前 3 日目、1 日目に IL-2 $10 \sim 200 \text{ u} / 0.1 \text{ ml}$ を尾静脈より注射し、菌感染 2 日後の生存マウス数を測定したところ表 11A に示す結果を得た。

表 11A E. Coli 菌に対する感染防禦効果

IL-2 投与量 (単位/匹/日)	生 存 数
対 照 (生食)	0/10
10	1/10
50	3/10
100	10/10
200	10/10

同じく、クレブジエラ・ニューモニア菌 株 19 を $5 \times 10^6 / 0.2 \text{ ml}$ 宛 ddY マウスに腹腔内注射し、感染 1 時間後に IL-2 $10 \sim 200 \text{ u} /$ 匹投与し、感染後 5 日目の生存数を測定し、表

- 51 -

尚 100 名のマウスが生存し、IL-2 により顕著なウイルス感染の治療効果が観察された。

実施例 18: レンチナンとの併用による同系縮退効果

H₂ C3H/HeN マウスに同系腫瘍 MM102 $3 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ を皮下移植しレンチナンを腫瘍移植日、7 日目、14 日目に投与 (10g/kg、静注) すると共にレンチナン投与後 2 日目に $10 \text{ u} / 0.1 \text{ ml}$ の IL-2 を腹腔内投与し、腫瘍移植後 35 日目に腫瘍のサイズより腫瘍増殖阻止率を測定すると共に移植後 70 日目のマウスの生存数を算出した。

表 12 に示す通り、レンチナンと IL-2 の併用による抗腫瘍効果の増進が観察された。

- 53 -

11B に示す結果をえた。

表 11B K. Pneumoniae 菌に対する感染防禦効果

IL-2 投与量 (単位/匹)	生 存 数
対 照 (生食)	2/10
10	2/10
50	3/10
100	8/10
200	9/10

実施例 17: ウイルス感染に対する延命効果

(BALB/C × C57BL/6) F₁ マウスに水泡性口内炎 (VSV) ウイルスを $1.2 \times 10^5 \text{ p.f.c.}$ 単位 / 0.05 ml 当りニューラル麻酔下鼻腔より感染させて IL-2 の抗ウイルス効果を検定した。

IL-2 はウイルス感染の 3 日前より感染後 5 日目まで連日 $50 \text{ u} / 0.05 \text{ ml}$ を静注した。対照群では 8 日目までに 80 名のマウスが死亡したのに対し、IL-2 投与群では 15 日目においても

- 52 -

表 12 レンチナンとの併用による同系縮退効果

レンチナン投与 投与量 (g/kg) 投与日 (移植後日数)	IL-2 投与 投与量 (単位/匹) 投与日 (移植後日数)	腫瘍増殖率 (%)	生存数/総数
対 照	対 照	0	9/12
1	1	-2.3	2/12
1	1	-4.5	4/12
1	1	42	7/12
1	1	78	12/12

※ 表 1 の精製レンチナンのものを投与した。

- 54 -

4 図面の簡単な説明

図1はIL-2のin vitroにおけるTリンパ球の増殖促進効果、図2はIL-2のin vitroにおけるキラーTリンパ球の記憶細胞よりのキラーTリンパ球の誘導促進効果、図3はIL-2によるナチュラルキラー細胞活性の増強(in vitro)、図4は極めて遅延型過敏反応のIL-2による増強効果、図5はIL-2の羊赤血球に対する遅延型過敏反応の修復効果、図6は手術後の転移腫瘍に対するIL-2の治療効果に関する実験結果を示す。

特許出願人 味の素株式会社

- 5 5 -

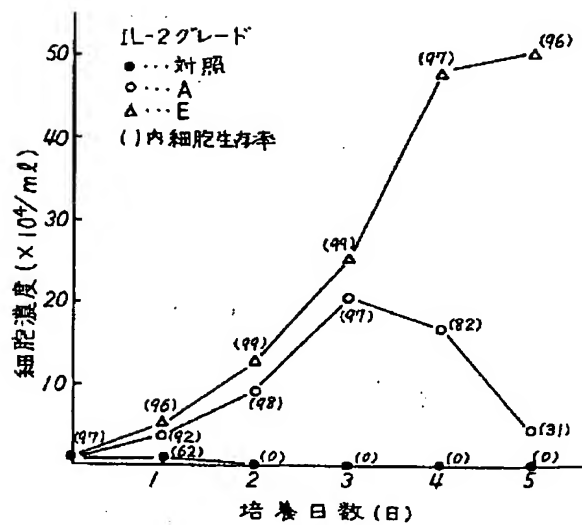


図 1A

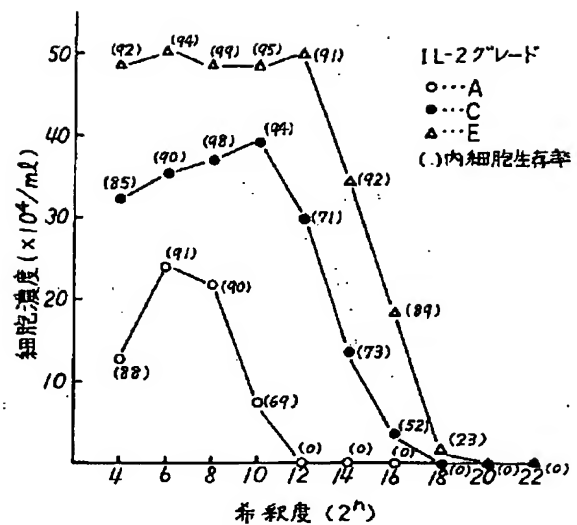


図 1B

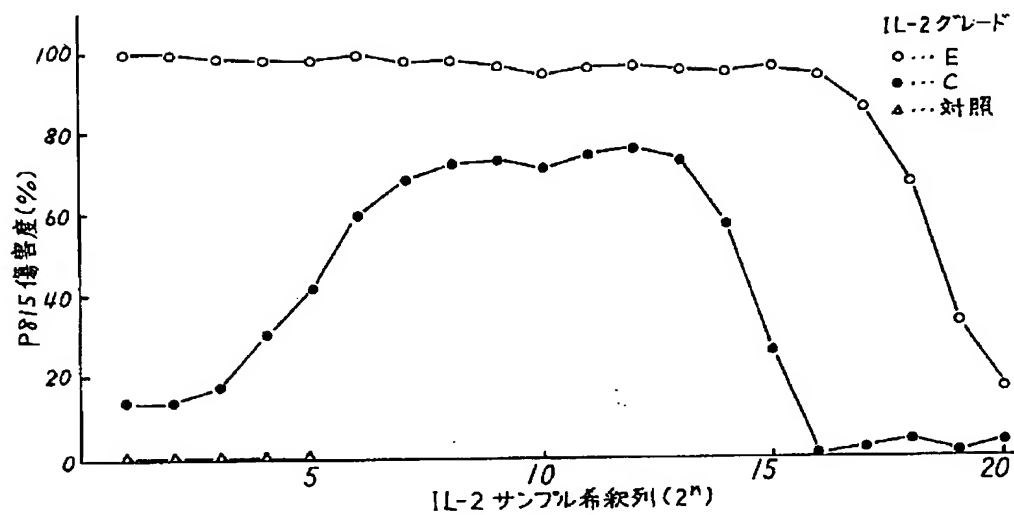


図 2

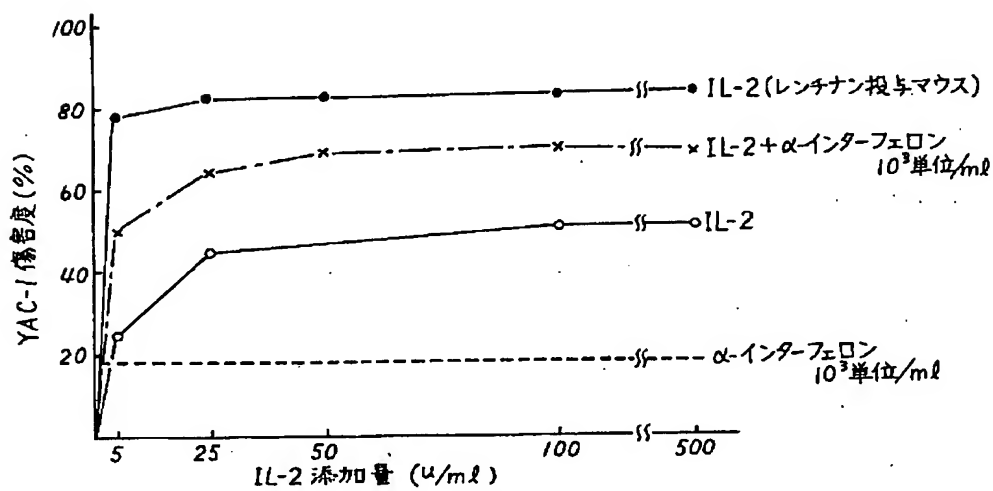


図 3

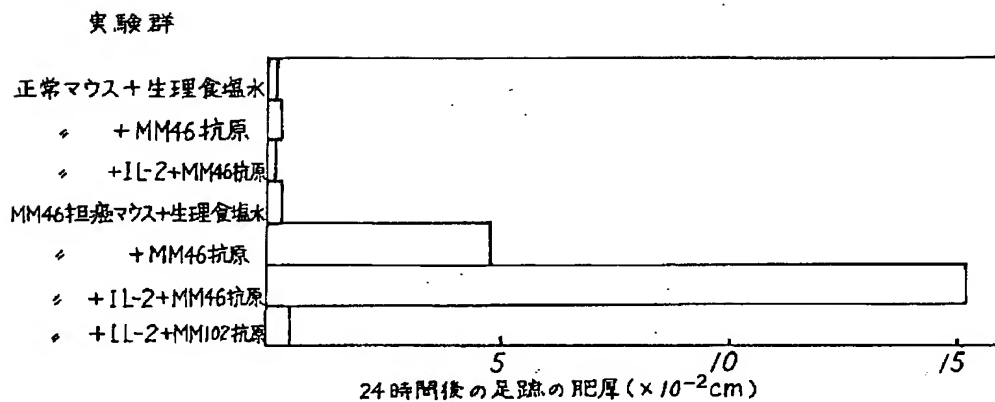


図 4

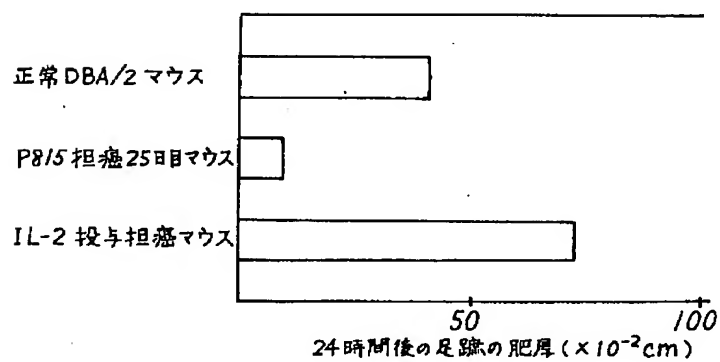


図 5

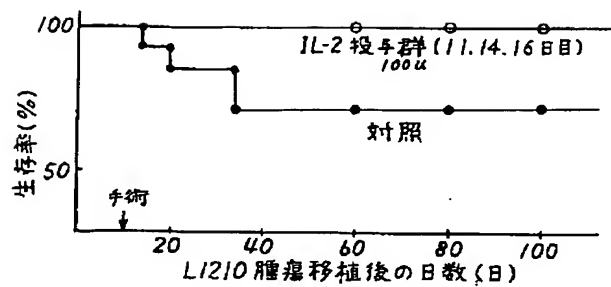


図 6A

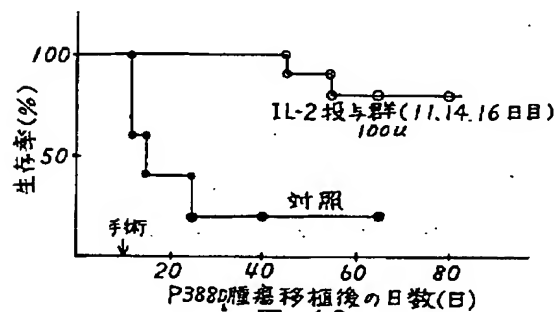


図 6B

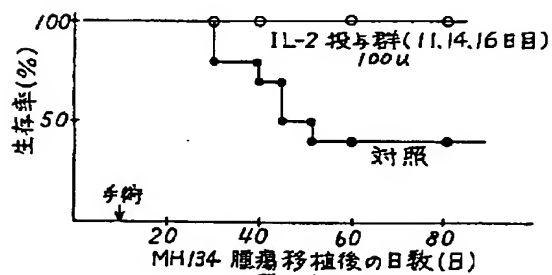


図 6C

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.